

**LIGNEE CELLULAIRE PROSTATIQUE ET SON UTILISATION POUR
L'OBTENTION D'UNE TUMEUR PROSTATIQUE ETABLIE CHEZ UN ANIMAL**

La présente invention porte sur une nouvelle lignée cellulaire établie de cellules épithéliales cancéreuses prostatiques de chien, sur un animal auquel ont été greffées des cellules de cette lignée cellulaire générant une tumeur prostatique établie et à des procédés d'identification de substances thérapeutiques pour la prévention ou le traitement du cancer de la prostate.

Le cancer de la prostate chez l'homme est une pathologie en croissance rapide, et constitue aujourd'hui au moins 85.000 nouveaux cas par an en Europe. Les traitements actuels des cancers localement avancés et métastatiques sont constitués par la castration chirurgicale ou médicale associé ou non à prescription d'antiandrogènes ; néanmoins, il s'agit d'un traitement palliatif car il devient inefficace dans un délai moyen de 12 à 15 mois, constituant la phase d'échappement au traitement hormonal de la maladie. A cette phase de l'échappement au traitement hormonal, les autres thérapeutiques reconnues, chimiothérapie, irradiation métabolique..., améliorent la qualité de vie des patients mais ne modifient pas l'évolution fatale de la maladie.

Différentes techniques ont été développées pour suivre l'effet thérapeutique éventuel d'un traitement, tel que décrit ci-dessus, des tumeurs prostatiques. Ce suivi consiste essentiellement à mesurer le taux d'antigènes spécifiques des cellules épithéliales de la prostate dans le sang. Lorsque le taux de ces antigènes augmente, cela peut être le reflet d'une augmentation anormale du nombre de cellules épithéliales prostatiques, signe d'une progression tumorale. Parmi ces antigènes, le PSA (pour prostate-specific antigen) est l'antigène marqueur le plus utilisé. Il est un membre de la famille des kallikreines.

De nombreuses publications sont relatives à des marqueurs diagnostic ou pronostic de la présence d'une tumeur prostatique.

Néanmoins, ceux-ci présentent toujours pour le médecin une incertitude sur le caractère distinctif de ces marqueurs pour une tumeur maligne ou une tumeur bénigne, ce qui rend difficile l'établissement d'un protocole thérapeutique.

5 Plus récemment, un autre antigène spécifique de la membrane des cellules épithéliales prostatiques, le PSMA (pour prostate specific membrane antigen) a reçu une grande attention de la communauté scientifique et médicale dans la mesure où il s'agit d'un nouvel antigène indépendant et spécifique des cellules épithéliales prostatiques. Cet 10 antigène est exprimé dans les cellules normales et malignes. Il s'agit d'une folate hydrolase, enzyme essentielle du métabolisme de la cellule prostatique. Cette enzyme a été clonée et séquencée (1), et son utilisation, ou l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de cet antigène, permet 15 d'affiner le diagnostic et le suivi thérapeutique des traitements, notamment par imagerie.

Si l'existence de marqueurs spécifiques des cellules épithéliales prostatiques permet un suivi des traitements (chirurgie, radiothérapie, traitements hormonaux et chimiothérapies), il n'existe pas aujourd'hui de modèle animal mimant de façon fiable la tumeur prostatique chez l'homme 20 et permettant de cibler de substances potentiellement actives par mesure non seulement du taux des marqueurs spécifiques dans le sang mais également par examen histopathologique et par mesure du volume de la tumeur.

Même s'il existe des lignées cellulaires prostatiques établies 25 utilisables dans des procédés de screening des substances potentiellement actives, telles que celles décrites notamment dans la demande de brevet WO 98/05797, l'homme du métier sait par expérience que les tests de screening sur des lignées cellulaires en culture *in vitro* ou en xénogreffes sous cutanées sur des modèles murins, s'ils sont indispensables dans un 30 premier temps, sont largement insuffisants dans un deuxième temps pour

mesurer une efficacité thérapeutique d'une molécule candidate au statut de principe actif de nouveaux médicaments et ce dans le cadre d'une expérimentation préclinique.

La prostate canine est considérée comme étant un bon modèle pour les études de prostate humaine dans la mesure où les glandes canines et humaines sont morphologiquement similaires et présentent une prédisposition à la transformation maligne ou bénigne. C'est une des prostates non humaines qui développe des carcinomes spontanés et la seule qui présente une évolution identique à celle de l'homme. Le cancer de la prostate chez les chiens est cliniquement agressif, avec des métastases fréquentes sur les ganglions lymphatiques régionaux, l'os et les poumons. En outre, des foyers de néoplasie intra-épithéliale prostatique élevée (PIN), bien qu'étant une étape intermédiaire dans la progression de l'épithélium normal vers le carcinome, ont été trouvés dans la majorité des prostates cancéreuses canines (J.W. Aquilina et al (1998) *The Prostate* 36: 189-193). Des PINs high grade chez le chien sont morphologiquement et histologiquement semblables au PIN humain avec une rupture de la couche de cellule basale, une élévation de l'index prolifératif et de la densité micro vasculaire.

Le carcinome prostatique est la plupart du temps diagnostiqué chez des chiens de compagnie âgés et si l'âge du chien est converti à l'âge physiologique de l'homme, l'âge moyen d'un diagnostic prostatique chez le chien est très proche, à savoir 70 ans et 67 ans respectivement pour le chien et pour l'homme.

Ces considérations étant faites, il s'avérait nécessaire de constituer un modèle animal sur lequel les résultats en termes de doses et d'efficacité pourraient sans trop de difficultés être transposables à l'homme.

La présente invention porte sur un procédé de production d'un animal mammifère non humain A porteur d'une tumeur prostatique provoquée après greffage dans la prostate dudit animal de 10^8 à 10^9

cellules d'une lignée cellulaire établie, obtenue après mise en culture et dissociation mécanique de cellules d'une tumeur prostatique spontanée existant chez un animal B de la même espèce ou d'une espèce différente.

Afin que la greffe des cellules établies en lignée dans une prostate d'un animal prenne dans les meilleures conditions, il est préférable que l'animal sur lequel sont prélevées les cellules tumorales prostatiques et l'animal receveur soient de la même espèce. Compte tenu de ce qui a été dit plus haut, entre la similitude étiologique des tumeurs prostatiques chez le chien et chez l'homme, le choix du chien comme animal pour établir un modèle de tumeur prostatique permettant de tester des produits et des méthodes de traitement apparaît comme particulièrement approprié.

Dans le procédé de l'invention, le greffage dans la prostate d'un animal de cellules tumorales préalablement établies en lignées doit être permanent, autrement dit ne pas risquer de subir un rejet de greffe. A cet effet, l'animal est traité par un immunodépresseur, comme par exemple la cyclosporine, de façon simultanée ou antérieure au greffage desdites cellules de la lignée. Lorsque la cyclosporine est utilisée, elle est administrée à l'animal à une dose comprise entre 1 et 10mg par kilo et par jour. Le traitement immunosupresseur débute de préférence au moins deux jours avant le greffage desdites cellules, et de préférence au moins cinq jours.

La présente invention porte également sur une ligne cellulaire établie obtenue après dissociation et mise en culture des cellules d'une tumeur prostatique spontanée existante chez un animal, les cellules de ladite lignée étant susceptibles d'être greffées dans la prostate d'un animal de la même espèce ou d'une espèce différente, et porteuse des caractéristiques essentielles des cellules épithéliales tumorales prostatiques humaines.

Pour les raisons expliquées plus haut, il est préférable que l'animal donneur, c'est-à-dire sur lequel les cellules prostatiques sont prélevées et

établies en lignées, et l'animal receveur soient de la même espèce ; de préférence, cette espèce est le chien de façon à constituer un modèle animal utilisable dans des essais pré-cliniques. Par utilisable, on entend la fiabilité de la transposition potentielle chez l'homme.

5 La lignée cellulaire est établie par prélèvement d'une tumeur prostatique établie chez un chien, dissociation mécanique de la tumeur et mise en culture dans des flacons contenant un milieu nutritif approprié. Après propagation dans ce milieu de culture, les cellules sont traitées par la trypsine / EDTA ; Après un certain nombre de passages, les cellules sont 10 ensuite progressivement adaptées à la culture dans le même milieu nutritif.

Dans l'invention, une attention toute particulière a été portée sur les caractéristiques de la lignée établie en culture, ainsi que de la tumeur prostatique obtenue après greffage des cellules de la lignée dans la prostate normale du chien.

15 Les caractéristiques essentielles d'une lignée établie selon l'invention et obtenue après dissociation d'une tumeur prostatique de chien puis mise en culture sont d'une part, que le caryotype n'est pas inférieur à 60 chromosomes, et, d'autre part, que le temps de doublement, compris entre 20 et 35 heures n'est pas modifié par la présence de 20 dihydrotestostérone quelle que soit la concentration de cette dernière. En outre, la lignée selon l'invention ne forme pas de colonies en agar .

Les lignées cellulaires selon l'invention et les tumeurs prostatiques obtenues après greffage de 10^7 à 10^9 cellules de ladite lignée ont des caractéristiques cytologiques et histochimiques communes et caractérisant 25 le cancer des cellules épithéliales prostatiques.

a) La première caractéristique importante est la reconnaissance des cellules tumorales par un anticorps monoclonal anti-PSMA humain. Le PSMA ou antigène membranaire spécifique de la prostate est un nouveau marqueur exprimé par les cellules épithéliales de la prostate normale, 30 hyperplasique ou cancéreuse. Le PSMA est une glycoprotéine

transmembranaire dont près de 95 % se situe à l'extérieur de la cellule. Cette protéine a été découverte grâce à un anticorps monoclonal, dénommé 7E11-C5.3, produit par Horoszewicz et al. (Anticancer Research, 1987, 7: 927-936) contre une préparation membranaire provenant de la lignée prostatique cancéreuse LNCaP. L'ADN complémentaire du PSMA a été cloné par Israeli et al. (Cancer Research, 1993, 53: 227-230) ce qui a permis d'en déduire sa structure primaire en acides aminés. Le PSMA est constitué de 750 acides aminés dont les 19 N-terminaux sont intracellulaires, les 24 suivants transmembranaires et les 707 restants extracellulaires. L'intérêt potentiel de ce nouveau marqueur prostatique est qu'il apparaît surexprimé dans le cancer prostatique et plus particulièrement dans les carcinomes peu différenciés et métastatiques ainsi que dans les cellules cancéreuses prostatiques après une thérapeutique androgéno-suppressive (Wright et al., Urological Oncology, 1995, 1: 18-28). L'existence d'un anticorps monoclonal anti-PSMA humain reconnaissant le PSMA humain et reconnaissant également le PSMA canin permet l'identification et le suivi de l'évolution des cellules cancéreuses ce qui constitue un gage de qualité du modèle animal selon l'invention. En effet, plus le modèle animal rassemblera d'éléments biologiques spécifiques de la prostate communs avec l'homme, plus l'extrapolation des résultats obtenus sera fiable.

La présente invention porte également sur un anticorps monoclonal anti-PSMA humain, appelé PSM-P12 et déposé à la CNCM le 6 août 1999 sous le numéro I-2280. Cet anticorps a été produit contre un peptide correspondant aux acides aminés 44 à 62 (cys – lys – ser – asn – glu – ala – thr – pro – lys – his – asn – met – lys – ala – phe – leu) et localisé dans la partie N-terminale de la structure extracellulaire du PSMA. Il a été sélectionné pour sa capacité à marquer les cellules épithéliales prostatiques humaines normales par immuno-histochimie. Cet anticorps reconnaît spécifiquement les cellules cancéreuses prostatiques canines du

modèle animal. Il reconnaît également les cellules de la lignée prostatique humaine LNCaP décrite par Horoszewicz et coll. (Cancer Research, 1983, 43: 1809-1818). En revanche, cet anticorps ne reconnaît pas les cellules des lignées humaines n'exprimant pas le PSMA comme la lignée DU-145 décrite par Stone et coll. (International Journal of Cancer, 1978, 21: 274-281). En revanche, une lignée cellulaire telle la lignée PC-3 décrite par Kaighn et coll. (Investigations in Urology, 1979, 17: 16-23) exprime un antigène membranaire PSM ayant une homologie partielle avec le PSMA de la lignée LNCaP, est reconnue partiellement par les anticorps anti-PSMA produits contre la même partie N-terminale de PSMA de la partie extracellulaire de l'antigène.

Tout anticorps monoclonal ayant les mêmes caractéristiques de reconnaissance épitopiques du PSMA doit être considéré comme un équivalent fonctionnel de celui-ci.

b) Les lignées cellulaires établies selon l'invention et les tumeurs prostatiques issues du greffage de la lignée dans une prostate canine ont également comme caractéristiques communes d'être reconnues par des anticorps de la cytokératine 19 et de la vimentine. A titre d'exemple, l'anticorps monoclonal anticytokératine 19 est produit par un hybridome A53-B/A2 et vendu par la société Sigma (Saint Louis, Missouri). L'anticorps anti-vimentine utilisé peut être un anticorps monoclonal de souris tel que celui référencé NCL-VIM-V9 est commercialisé par Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, upon Tyne, UK.

De façon préférée, les lignées et la tumeur obtenues chez l'animal ont également comme caractéristique de contenir des antigènes reconnus par des anticorps dirigés contre l'antigène Ki67 humain et/ou contre l'antigène PSA humain. L'antigène Ki67 est un marqueur de prolifération cellulaire que l'on retrouve préférentiellement sur les cellules transformées. A titre d'exemple, l'anticorps antiPSA peut être l'anticorps polyclonal A0562 commercialisé par Dako (Glostrup, Danemark).

c) Les cellules et la tumeur prostatique obtenues par greffage des cellules ne sont pas reconnues par des anticorps monoclonaux dirigés contre la cytokératine 18 (Dako) ni contre des récepteurs androgéniques des cellules épithéliales prostatiques humaines.

5 Une lignée cellulaire établie selon l'invention est la lignée DPC-1 déposée à la CNCM le 6 août 1999 sous le numéro I-2279. Cette lignée a un temps de doublement de 27 heures, qui n'est pas modifié par la présence de di-hydrotestostérone à différentes concentrations. Elles ne forment pas de colonies en agar. Son caryotype est de 67 à 70 10 chromosomes au lieu des 78 chromosomes normaux dans les lignées cellulaires canines. Sa tumorégénérité est de 100 % chez la souris nude en 3 à 5 semaines. L'ensemble des caractérisations immunoscintigraphiques et histo-chimiques de la lignée est décrit dans l'exemple 1 ci-dessous.

15 La présente invention porte également sur un animal mammifère non humain porteur d'une tumeur prostatique susceptible d'être obtenue après greffage dans la prostate dudit animal de 10^8 à 10^9 cellules d'une lignée cellulaire établie après mise en culture d'une tumeur prostatique, de préférence issue de la même espèce animale, dissociée mécaniquement puis trypsinée après plusieurs passages dans un milieu nutritif. L'espèce 20 en question préférée est le chien. La tumeur prostatique provoquée chez cet animal selon l'invention présente les mêmes caractéristiques que celles de la lignée cellulaire selon l'invention. Ces caractéristiques sont communes à une tumeur prostatique de chien et à une tumeur prostatique humaine. L'animal selon l'invention, et de préférence le chien, constitue 25 donc un excellent modèle de laboratoire reproduisant les caractéristiques de la tumeur prostatique humaine et donc en fait un outil de choix dans les expérimentations pré-cliniques de substances susceptibles de soigner le cancer prostatique chez l'homme et chez le chien.

30 C'est également l'un des objets de la présente invention de fournir une méthode pour identifier une substance susceptible de traiter une

tumeur de la prostate, ladite méthode incluant l'administration à des doses effectives de ladite substance à un animal, et la détection et la mesure par comparaison avec une substance non suspecte d'avoir un effet thérapeutique d'une incidence sur une réduction de ladite tumeur.

5 L'animal en question dans cette méthode est un animal porteur d'une tumeur prostatique, elle-même développée par greffage de cellules d'une lignée préalablement établie, ladite lignée provenant de la mise en culture d'une tumeur prostatique préalablement développée dans un animal de préférence de la même espèce que l'animal auquel les cellules 10 sont greffées. De façon préférée, l'animal en question est le chien compte tenu des similitudes des caractères phénotypiques et histologiques des tumeurs prostatiques chez le chien et chez l'homme.

15 Par dose effective, on entend, comme dans toute méthode de screening, l'administration d'une dose susceptible d'avoir un effet préventif ou curatif sur le développement d'un cancer de la prostate.

Par substance, on entend toute substance d'intérêt thérapeutique potentiel qu'il s'agisse par exemple d'une substance organique basée sur différents squelettes chimiques de base ou de macromolécules biologiques ayant un effet de répression ou d'inhibition de l'expression de gènes 20 spécifiques du cancer de la prostate ; cela peut être enfin un vecteur ou d'une particule virale porteur d'une séquence d'intérêt appropriée pour la thérapie génique de ce type de cancer.

25 Par « gène spécifique de la prostate », on entend ici un gène dont l'expression est limitée aux cellules de la prostate et plus particulièrement à ses cellules épithéliales, et dont l'expression est généralement indétectable dans des cellules normales dérivées d'autres tissus que ceux de la prostate. De manière générale, et au fur et à mesure que la connaissance de l'étiologie du développement du cancer de la prostate permettra de faire l'hypothèse que tel ou tel candidat pourrait permettre de faire régresser une 30 tumeur ou transformer une cellule tumorale en cellule normale. La méthode

selon l'invention qui met en œuvre un modèle animal représentatif de ce qui pourrait se passer chez l'homme pourra donc être utilisée dans des essais pré-cliniques.

5 L'incidence de l'effet d'une substance sur la tumeur peut être mesurée par tous les moyens connus à la disposition de l'homme du métier. Il peut s'agir par exemple de l'immunoscintigraphie ou d'examens histologiques d'une biopsie de la tumeur. L'immunoscintigraphie présente l'avantage de permettre l'utilisation d'une panoplie d'anticorps monoclonaux spécifiques de tel ou tel antigène, lui-même caractérisant l'état de la cellule 10 épithéliale prostatique.

En particulier, la détection et la mesure de l'incidence éventuelle d'une substance peuvent être réalisées par utilisation d'un anticorps monoclonal anti PSMA humain notamment l'anticorps PSM-P12 déposé à la CNCM le 6 août 1999 sous le numéro I-2280.

15 La méthode d'identification d'une substance d'intérêt thérapeutique selon l'invention c'est à dire susceptible de traiter une tumeur de la prostate est également applicable à un principe actif tel que décrit ci-dessus (substance chimique, vecteur ou virus pour la thérapie génique, etc.) couplé à un ligand d'un récepteur spécifique des cellules tumorales de la 20 prostate. Ce ligand peut avoir l'avantage de cibler la substance d'intérêt thérapeutique potentiel vers sa cible, en épargnant les cellules qui ne portent pas le récepteur dudit ligand. Par couplage, on entend tout type de couplage qu'il soit covalent ou électrostatique. La liaison covalente, le cas échéant hydrolysable, sera préférée.

25 Un candidat intéressant comme ligand est un anticorps monoclonal spécifique d'un antigène de surface de la cellule prostatique. Compte-tenu des propriétés et des spécificités des anticorps anti-PSMA décrites plus haut, l'anticorps PSM-P12 est approprié à la spécificité recherchée. Il a en outre été observé que cet anticorps avait la capacité d'internaliser dans la 30 cellule une substance qui lui est couplée.

L'invention porte également sur le produit de couplage entre une substance susceptible de détruire ou de guérir les cellules épithéliales transformées constitutives du cancer de la prostate ou de métastases de celui-ci, et un ligand spécifique desdites cellules.

5 Elle porte plus particulièrement sur le produit de couplage entre l'anticorps PSM-P12 et une substance d'intérêt thérapeutique pour le cancer de la prostate.

10 L'invention porte également sur un procédé d'obtention d'un médicament pour la prophylaxie ou le traitement des tumeurs de la prostate ou de cellules transformées métastatiques de celui-ci, caractérisé à ce que l'on mette en œuvre en tant que constituant essentiel dudit médicament le produit de couplage entre l'anticorps PSM-P12 et une substance d'intérêt thérapeutique. Comme substance d'intérêt thérapeutique, on peut comprendre tant les substances chimiques, les 15 isotopes radioactifs que des substances obtenues par les techniques de recombinaison génétique. Dans le cadre de la thérapie du cancer de la prostate, les hormones de type GNRH ou leurs analogues sont appropriées. L'homme du métier peut également envisager le couplage du complexe constitué d'un produit de thérapie génique et de son vecteur. Il 20 peut s'agir alors d'un plasmide porteur de la substance que l'on souhaite exprimer dans les cellules prostatiques malades, ou de virus défectifs utilisés dans ce type de thérapie. Pour une revue des différents moyens utilisés à cet égard, on peut se reporter à "Gene delivery Systems" OECD documents, 1996, 2 rue André-Pascal, 75775 Paris Cedex 16, France. De 25 fait, l'anticorps PSM-P12 s'avère être un excellent outil de ciblage de médicaments.

30 L'homme du métier comprendra de façon évidente que tout type d'anticorps monoclonal, ou plus largement de ligand d'un antigène spécifique des cellules épithéliales de la prostate, et ayant comme caractéristique d'internaliser des molécules qui lui sont attachées après

liaison avec le récepteur spécifique dudit ligand à la surface de la cellule, est un équivalent fonctionnel de l'anticorps monoclonal PSM-P12 dans ce type d'application.

Dans la méthode d'identification d'une substance d'intérêt thérapeutique, ou dans le procédé de fabrication d'un médicament, on peut envisager d'incorporer au produit de couplage un deuxième anticorps de type anti-idiotype. Dans le cas présent, on entend par anticorps anti-idiotype tout anticorps, de préférence monoclonal, qui a une affinité spécifique pour le site conformationnel constitué par la liaison entre le premier anticorps, notamment PSM-P12 et son ligand. L'incorporation d'un tel anticorps présente un double avantage : le premier est que sa présence peut empêcher l'internalisation dans la cellule du produit de couplage entre le premier anticorps et les substances d'intérêt thérapeutique, prévenant ainsi la destruction ou la métabolisation de ladite substance quand celle-ci agit comme médiateur par effet de membrane. Le deuxième avantage s'applique plus particulièrement quand on met en œuvre une méthode d'identification d'une substance thérapeutique, dans la mesure où toute fixation non spécifique du premier anticorps peut être alors éliminée, puisque le premier anticorps n'est reconnu par le deuxième anticorps que lorsqu'il est fixé par affinité à l'antigène membranaire des cellules prostatiques.

Dans le procédé d'identification des substances d'intérêt thérapeutique, les anticorps peuvent être marqués par tout moyen connu de l'homme du métier au moment de sa mise en œuvre. Il peut s'agir d'isotopes radioactifs, tels le technitium 99 couplé par la méthode de Bolton-Hunder (ref), fluorochromes, d'enzymes, de glutéraldéhyde, de periodate, les méthodes FITC ou TRITC, toutes ces techniques bien connues étant décrites dans Harlow E et al, "Antibodies: A laboratory Manual", Cold Spring Harbor, NY, 346-355 (1988) ; Vollmer et al, Bull, World Health Organ, 53, 55 (1976) ; Avrameas et al, Scand. J. Immunol., 8,

Suppl. 7, 7 (1978) ; Wilson et al "Immunofluorescence and Related Staining Techniques," Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 215 (1978) ; Hijmans et al, Clin. Exp. Immunol., 4, 457 (1969) et Goding et al, J. Immunol. Meth., 13, 215 (1976).

5 Autrement dit, la spécificité des anticorps reconnaissant tout ou partie des acides aminés 44 à 62 du PSMA, font de ces derniers un outil de choix dans leur utilisation :

10 - Soit directement pour identifier les cellules épithéliales porteuses de cet antigène,

15 - Soit couplés à une substance d'intérêt thérapeutique, d'une part pour sélectionner cette dernière, d'autre par pour traiter les cellules, en tirant parti de ses capacités d'internalisation et de sa spécificité.

15 Dans le premier cas, l'utilisation d'un anticorps anti-idiotype tel que défini ci-dessus peut permettre d'augmenter la spécificité du produit de couplage et d'en empêcher son internalisation dans les cellules.

20 Plus généralement, la présente invention fournit un modèle animal fiable du cancer de la prostate, un procédé de screening de médicaments susceptibles de traiter des tumeurs de la prostate. Elle fournit également une lignée cellulaire établie issue d'une tumeur prostatique de chien, et susceptible d'être greffée dans la prostate d'un animal sain conduisant à la formation d'une tumeur stable. La présente invention fournit également un anticorps monoclonal spécifique de l'antigène PSMA et qui présente les caractéristiques, d'une part, d'être spécifique des cellules épithéliales 25 prostatiques et, d'autre part, d'avoir la capacité d'internaliser une substance à laquelle il serait attaché, permettant ainsi de cibler de façon spécifique une substance d'intérêt thérapeutique dans les cellules de la prostate. Pour la première fois, les inventeurs fournissent donc un système global permettant à la fois de réaliser une expérimentation pré-clinique pour 30 valider la dose et l'efficacité d'un principe actif d'un futur médicament, et de

sélectionner des nouveaux médicaments qui pourraient être utiles dans l'arsenal thérapeutique pour lutter contre le cancer de la prostate.

Partie expérimentale

Les modes de réalisation décrits dans la partie expérimentale ci-après explicitée par les figures 1 à 5, illustrent, sans le limiter, le procédé et les produits selon l'invention.

Les figures ont la signification suivante :

Figure 1 : la figure 1 représente un marquage positif en immunofluorescence de la lignée DPC-1 :

- 10 - avec un anticorps monoclonal de souris anti-cytokeratine 19 humain à 10 µg/ml (figure 1a), relevé par un anticorps polyclonal de lapin anti-souris marqué à la fluorescéine ;
- 15 - avec un anticorps polyclonal de lapin anti-PSA humain à 10 µg/ml (figure 1b), relevé par un anticorps polyclonal de souris anti-lapin marqué à la fluorescéine.

Figure 2 : comparaison de la réactivité de la lignée humaine LNCaP et de la lignée DPC-1 quant à leur réactivité vis-à-vis de l'anticorps anti-PSMA P12 humain. La figure 2a représente le marquage positif en immunofluorescence de la lignée DPC-1 avec l'anticorps monoclonal de souris anti-PSMA P12 humain à 10 µg/ml, relevé par un anticorps polyclonal de lapin anti-souris marqué à la fluorescéine. La figure 2b est un marquage dans des conditions expérimentales identiques de la lignée humaine LNCaP avec l'anticorps monoclonal de souris anti PSMA P12 humain.

25 La figure 3 représente les images tomodensitométriques de la tumeur après injection de cellule de la lignée DPC-1 dans la prostate canine. Les figures 3a et 3b représentent respectivement l'image tomodensitométrique en coupe transversale du modèle canin orthopédique DPC-1 respectivement à J - 0 et J - 14. Le lobe gauche montre au site 30 d'injection une zone hypodense triangulaire à base externe avec

trois bulles d'air (3a) et un aspect rétractile avec une couronne tissulaire hypodense (figure 3b). La figure 3c est une image tomodensitométrique (scanner avec injection de produits de contraste) en coupe transversale du modèle orthotopique DPC-1 à dix semaines. Une importante couronne tissulaire hypodense entoure les trois quarts de la prostate. La figure 3d est également une image tomodensitométrique prise dans les mêmes conditions, en coupe transversale au niveau iliaque du modèle canin orthotopique DPC-1 à dix semaines. Une volumineuse masse ganglionnaire métastatique hétérogène adhérente au plan osseux vertébral 5 est visible au niveau iliaque gauche.

10

Figure 4 : cette figure représente deux images échographiques de la prostate endorectale du modèle canin orthotopique DPC-1 à deux mois. Dans la figure 4a, on peut observer que le lobe gauche montre une zone hypodense périphérique ainsi qu'une image hyperdense centrale. Dans la 15 figure 4b, le trait hyperdense (blanc) indique l'aiguille de biopsie pénétrant au niveau de la zone hypodense périphérique suspecte.

Figure 5 : dans cette figure sont rassemblées les images histologiques d'une biopsie prostatique endorectale (lobe gauche) du modèle canin orthotopique DPC-1 à deux mois. La figure 5a est un 20 grossissement multiplié par 4 ; on peut observer que la carotte est envahie en presque totalité par une prolifération tumorale carcinomateuse. Sur la figure 5b, on observe la présence d'une prolifération tumorale carcinomateuse très indifférenciée disposée en Ap ; les nucléoles sont bien visibles. Il s'agit d'un grossissement multiplié par 25. La figure 5c 25 (grossissement multiplié par 25) indique la présence d'une prolifération tumorale carcinomateuse très indifférenciée disposée en Ap ; on voit en haut de l'image la présence de stroma prostatique (fibres musculaires). La figure 5d est une image à grossissement multiplié par 10 de la biopsie dans les mêmes conditions que celles de la figure 5b.

30 La figure 6 représente une image en immunoscintigraphie obtenue

avec un anticorps anti-PSM-P12 marqué à l'iode¹³¹I ; l'anticorps marqué est injecté à un chien 12 semaines après une injection orthotopique de la lignée DPC-1. A titre de témoin, le même chien a subi une scintillographie osseuse avec du ⁹⁹Technetium. De gauche à droite son représentées :

5 – une vue ventrale de la scintillographie osseuse,
 – une vue dorsale de la scintillographie osseuse,
 – une vue ventrale en l'immunoscorpigraphie.

La figure 7 représente le marquage en immunofluorescence de prostate cancéreuse et normale humaine en coupe congelée, avec 10 l'anticorps monoclonal anti-PSMA-P12 humain. L'anticorps monoclonal de souris anti-humain est dosé à 10 µg/ml, est révélé par un anticorps polyclonal de lapin anti-souris marqué à la fluorescéine pour la tumeur prostatique (figure 7a) et à la peroxidase pour la prostate normale (figure 7b).

15

Exemple 1 : Etablissement de la lignée DPC-1

Une biopsie de tumeur prostatique spontanée d'au moins 5 g non métastatique est excisés dans un chien de race Doberman Pincher de onze ans puis déchiquetée en petits morceaux d'environ 3 mm³ et mise en 20 culture dans des flacons de 25cm² en milieu RPMI avec 5 % de sérum de veau fœtal.

Après douze passages, les cellules qui ont une croissance en monocouche sont trypsinées et récupérées.

Analyse par immuno histochimie :

25 Le procédé expérimental de l'analyse immuno histochimique est décrit dans O. Cussenot et al (1994), *Experimental Cell Research*, 214: 83-92.

Brièvement, les cellules sont fixées avec un mélange méthanol/acétone (2/1) pendant 15 min. Après trois lavages en PBS, en 30 présence de 0,1 % de BSA, l'immunofluorescence a été réalisée par

incubation à température ambiante pendant 1 heure avec la dilution appropriée des anticorps monoclonaux ou polyclonaux. Les cellules sont ensuite incubées avec le second anticorps marqué à la fluorescéine. Pour chaque essai, un contrôle négatif a été réalisé en utilisant des anticorps monoclonaux ou polyclonaux n'ayant aucune chance d'avoir une affinité pour les antigènes cellulaires mais de la même sous-classe d'immuno-globuline.

Anticorps utilisés :

Les anticorps utilisés sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous.

Paramètres	Type Ac	Résultats
Cytokératine 8	M	Neg
Cytokératine 14	M	Pos
Cytokératine 18	M	Neg
Cytokératine 19	M	Pos
Vimentine	M	Pos
Ki 67	M	Pos
PSA	P	Pos
PAP	M	Neg
CGA	P	Neg
NSE	M	Neg
Récepteur Androgènes	M	Neg
Récepteur EGF	M	Neg
Récepteur FGF	M	Neg
PSMA (PSM-P12)	M	Pos

Dans la colonne centrale, la lettre "M" indique qu'il s'agit d'un anticorps monoclonal et la lettre d'un anticorps polyclonal. Dans la troisième colonne, le terme "Pos" indique l'existence d'une réaction positive entre l'anticorps monoclonal ou polyclonal sur la lignée établie canine.

Résultats en immunofluorescence :

Les photographies de la figure 1 sont une illustration du caractère non ambigu de la réactivité de la lignée DPC-1 avec l'anticorps monoclonal anti-cytokératine 19 (1a) ou le polyclonal anti-PSA humain (1b).

La figure 2 indique clairement que le nouvel anticorps monoclonal anti PSMA-P12 humain reconnaît aussi bien la lignée canine DPC-1 que la lignée humaine LNCaP (figures 2a et 2bj respectivement). Les expériences

indiquées dans l'exemple 5 ci-après et illustrées par la figure 6 montrent que, par la même technologie, cet anticorps réagit de la même manière avec un cancer de prostate humain.

Caractéristiques de croissance :

5 Le temps de de doublement de la population est mesuré dans des plaques à 24 puits ensemencés initialement à la densité de 5×10^3 cellules par puits. Le nombre de cellules dans 12 puits séparés est déterminé 3 jours successivement en comptant les noyaux après une lyse cellulaire. Brièvement, les cellules sont traitées successivement avec un tampon
10 hypotonique (10mM Hepes, 1,5mM MgII₂), une solution de lyse (3ml d'acide acétique glacial et 5g MgCL₂ de diethylhexadecyl dimethylbromure d'ammonium pour 100ml d'eau distillée) est fixée avec 12,5% de formalaldehyde dans du tampon PBS. Le comptage des noyaux après lyse cellulaire apparaît être le moyen le plus fiable pour déterminer le nombre
15 de cellules, dans la mesure où les cellules de la lignée DPC-1 résistent le plus souvent au traitement trypcine-EDTA.

Le temps de doublement de la lignée est de 27 heures et n'est pas modifiée par la présence de di-hydrotestostérone à différentes concentrations.

20 Cytogénétique :

Le caryotype, évalué par les méthodes classiques (voir références) indique une hypoploidie, à savoir que les cellules de la lignée DPC-1 contiennent 67 à 70 chromosomes (au lieu de 78).

25 L'ensemble de résultats ci-dessus indique que la lignée DPC-1 présente toutes les caractéristiques essentielles des cellules de tumeur prostatique humaine, à savoir un caryotype d'au moins 60 chromosomes et un taux de croissance non modifié par l'addition de di-hydrotestotérone, une reconnaissance positive par les anticorps monoclonaux PSMA-P12 anti-cytokeratine 19, anti-PSA.

Exemple 2 : établissement d'une tumeur prostatique stable

2 \times 10⁸ cellules de la lignée DPC-1 sont injectées dans une prostate de chien sain, dans le lobe gauche, comme cela apparaît dans la figure 3a, sous contrôle d'un tomodensitomètre scanner. Les cellules 5 sont en suspension dans 1 ml de RPMI sans sérum, et le chien utilisé est un chien golden retriever de 9 ans immunodéprimé depuis une semaine (J - 7) avec 3 mg/kg et par jour de cyclosporine administrée par voie orale.

L'aspect et la formation de la tumeur sont suivis par image 10 tomodensitométrique. Après deux semaines, le lobe gauche montre un aspect atteint (figure 3b). Après douze semaines (photos 3c et 3d), et en biopsie (figure 4 et figure 5), après deux mois, il y avait des métastases évidentes, et la cyclosporine était arrêtée. Le chien était sacrifié après 15 quatre mois et une autopsie confirme les métastases lymphatiques et même pulmonaires.

La figure 5 représente les coupes histologiques des tumeurs après biopsie qui confirment l'existence d'une tumeur établie dans le lobe gauche de la prostate.

Les résultats obtenus en immunofluorescence à partir de biopsie 20 de ce cancer canin établi indiquent les mêmes réactivités avec les anticorps monoclonaux présentés dans le tableau 1 ci-dessus que les réactivités obtenues avec la lignée DPC-1, et qui présentent les caractéristiques d'un cancer prostatique humain.

Exemple 3 : tumorigénicité de la lignée DPC-1

25 Outre le greffage de la lignée dans une prostate canine et les résultats décrits dans l'exemple 2 ci-dessus, les cellules ont été injectées dans le coussinet des pattes d'une souris nude. La formation d'une tumeur dans les ganglions lymphatiques est observée dans 100 % des cas après trois à six semaines suivant l'injection.

Exemple 4 : spécificité de l'anticorps monoclonal PSMA - P12

Nous rappelons que cet anticorps monoclonal a été produit contre un peptide de 20 acides aminés localisés dans la structure extra cellulaire du PSMA. Il a été sélectionné pour ses capacités à marquer les cellules épithéliales prostatiques humaines normales par immuno histochimie. Les figures 2a et 2b indiquent respectivement la spécificité de l'anti PSMA P12, tant sur la lignée canine DPC-1 que la lignée humaine LNCaP, ce qui en tant que tel est un argument important en faveur de la validité de cette lignée comme modèle de lignée prostatique tumorale de souris. La figure 6 montre que cet anticorps est spécifique tant sur les cancers de prostate humain que sur les cancers de prostate canin, ce qui indique également que le modèle animal porteur de la tumeur établie après greffage des cellules de la lignée DPC-1 est un modèle dont la tumeur reflète fidèlement les caractéristiques d'une tumeur humaine. Il a en effet été observé que cet anticorps présente la même spécificité pour la prostate canine (figure 6) que pour la prostate humaine (figure 7).

L'ensemble des expériences décrites ci-dessus indique que l'invention fournit à l'homme du métier un moyen direct de réalisation d'un modèle animal de tumeur prostatique utilisable notamment dans la recherche pré clinique. Ces expériences démontrent également que le nouvel anticorps monoclonal sélectionné est un outil de choix dans le diagnostic et le suivi thérapeutique du cancer de la prostate.

LIGNEE CELLULAIRE PROSTATIQUE ET SON UTILISATION POUR
L'OBTENTION D'UNE TUMEUR PROSTATIQUE ETABLIE CHEZ UN ANIMAL

La présente invention porte sur une nouvelle lignée cellulaire établie de cellules épithéliales cancéreuses prostatiques de chien, sur un 5 animal auquel ont été greffées des cellules de cette lignée cellulaire générant une tumeur prostatique établie et à des procédés d'identification de substances thérapeutiques pour la prévention ou le traitement du cancer de la prostate.

Le cancer de la prostate chez l'homme est une pathologie en 10 croissance rapide, et constitue aujourd'hui au moins 85.000 nouveaux cas par an en Europe. Les traitements actuels des cancers localement avancés et métastatiques sont constitués par la castration chirurgicale ou médicale associé ou non à prescription d'antiandrogènes ; néanmoins, il s'agit d'un traitement palliatif car il devient inefficace dans un délai moyen de 12 à 15 36 mois, constituant la phase d'échappement au traitement hormonal de la maladie. A cette phase de l'échappement au traitement hormonal, les autres thérapeutiques reconnues, chimiothérapie, irradiation métabolique..., améliorent la qualité de vie des patients mais ne modifient pas l'évolution fatale de la maladie.

Différentes techniques ont été développées pour suivre l'effet thérapeutique éventuel d'un traitement, tel que décrit ci-dessus, des tumeurs prostatiques. Ce suivi consiste essentiellement à mesurer le taux 20 d'antigènes spécifiques des cellules épithéliales de la prostate dans le sang. Lorsque le taux de ces antigènes augmente, cela peut être le reflet d'une augmentation anomale du nombre de cellules épithéliales prostatiques, signe d'une progression tumorale. Parmi ces antigènes, le PSA (pour prostate-specific antigen) est l'antigène marqueur le plus utilisé. Il est un membre de la famille des kallikreines.

De nombreuses publications sont relatives à des marqueurs 30 diagnostic ou pronostic de la présence d'une tumeur prostatique.

mesurer une efficacité thérapeutique d'une molécule candidate au statut de principe actif de nouveaux médicaments et ce dans le cadre d'une expérimentation préclinique.

La prostate canine est considérée comme étant un bon modèle pour les études de prostate humaine dans la mesure où les glandes canines et humaines sont morphologiquement similaires et présentent une prédisposition à la transformation maligne ou bénigne. C'est une des prostates non humaines qui développe des carcinomes spontanés et la seule qui présente une évolution identique à celle de l'homme. Le cancer de la prostate chez les chiens est cliniquement agressif, avec des métastases fréquentes sur les ganglions lymphatiques régionaux, l'os et les poumons. En outre, des foyers de néoplasie intra-épithéliale prostatique élevée (PIN), bien qu'étant une étape intermédiaire dans la progression de l'épithélium normal vers le carcinome, ont été trouvés dans la majorité des prostates cancéreuses canines (J.W. Aquilina et al (1998) *The Prostate* 36: 189-193). Des PINs high grade chez le chien sont morphologiquement et histologiquement semblables au PIN humain avec une rupture de la couche de cellule basale, une élévation de l'index prolifératif et de la densité micro vasculaire.

Le carcinome prostatique est la plupart du temps diagnostiqué chez des chiens de compagnie âgés et si l'âge du chien est converti à l'âge physiologique de l'homme, l'âge moyen d'un diagnostic prostatique chez le chien est très proche, à savoir 70 ans et 67 ans respectivement pour le chien et pour l'homme.

Ces considérations étant faites, il s'avérait nécessaire de constituer un modèle animal sur lequel les résultats en termes de doses et d'efficacité pourraient sans trop de difficultés être transposables à l'homme.

La présente invention porte sur un procédé de production d'un animal mammifère non humain A porteur d'une tumeur prostatique provoquée après greffage dans la prostate dudit animal de 10^7 à 10^9

établies en lignées, et l'animal receveur soient de la même espèce ; de préférence, cette espèce est le chien de façon à constituer un modèle animal utilisable dans des essais pré-cliniques. Par utilisable, on entend la fiabilité de la transposition potentielle chez l'homme.

5 La lignée cellulaire est établie par prélèvement d'une tumeur prostatique établie chez un chien, dissociation mécanique de la tumeur et mise en culture dans des flacons contenant un milieu nutritif approprié. Après propagation dans ce milieu de culture, les cellules sont traitées par la trypsine / EDTA ; Après un certain nombre de passages les cellules sont
10 ensuite progressivement adaptées à la culture dans le même milieu nutritif.

Dans l'invention, une attention toute particulière a été portée sur les caractéristiques de la lignée établie en culture, ainsi que de la tumeur prostatique obtenue après greffage des cellules de la lignée dans la prostate normale du chien.

15 Les caractéristiques essentielles d'une lignée établie selon l'invention et obtenue après dissociation d'une tumeur prostatique de chien puis mise en culture sont d'une part, que le caryotype n'est pas inférieur à 60 chromosomes, et, d'autre part, que le temps de doublement, compris entre 20 et 35 heures n'est pas modifié par la présence de
20 dihydrotestostérone quelle que soit la concentration de cette dernière. En outre, la lignée selon l'invention ne forme pas de colonies en agar.

Les lignées cellulaires selon l'invention et les tumeurs prostatiques obtenues après greffage de 10^7 à 10^9 cellules de ladite lignée ont des caractéristiques cytologiques et histochimiques communes et caractérisant
25 le cancer des cellules épithéliales prostatiques.

a) La première caractéristique importante est la reconnaissance des cellules tumorales par un anticorps monoclonal anti-PSMA humain. Le PSMA ou antigène membranaire spécifique de la prostate est un nouveau marqueur exprimé par les cellules épithéliales de la prostate normale,
30 hyperplasique ou cancéreuse. Le PSMA est une glycoprotéine

transmembranaire dont près de 95 % se situe à l'extérieur de la cellule. Cette protéine a été découverte grâce à un anticorps monoclonal, dénommé 7E11-C5.3, produit par Horoszewicz et al. (Anticancer Research, 1987, 7: 927-936) contre une préparation membranaire provenant de la lignée prostatique cancéreuse LNCaP. L'ADN complémentaire du PSMA a été cloné par Israeli et al. (Cancer Research, 1993, 53: 227-230) ce qui a permis d'en déduire sa structure primaire en acides aminés. Le PSMA est constitué de 750 acides aminés dont les 19 N-terminaux sont intracellulaires, les 24 suivants transmembranaires et les 707 restants extracellulaires. L'intérêt potentiel de ce nouveau marqueur prostatique est qu'il apparaît surexprimé dans le cancer prostatique et plus particulièrement dans les carcinomes peu différenciés et métastatiques ainsi que dans les cellules cancéreuses prostatiques après une thérapie androgéno-suppressive (Wright et al., Urological Oncology, 1995, 1: 18-28). L'existence d'un anticorps monoclonal anti-PSMA humain reconnaissant le PSMA humain et reconnaissant également le PSMA canin permet l'identification et le suivi de l'évolution des cellules cancéreuses ce qui constitue un gage de qualité du modèle animal selon l'invention. En effet, plus le modèle animal rassemblera d'éléments biologiques spécifiques de la prostate communs avec l'homme, plus l'extrapolation des résultats obtenus sera fiable.

La présente invention porte également sur un anticorps monoclonal anti-PSMA humain, appelé PSM-P12 et déposé à la CNCM le 6 août 1999 sous le numéro I-2280. Cet anticorps a été produit contre un peptide correspondant aux acides aminés 44 à 62 (lys - ser - ser - asn - glu - ala - thr - asn - ile - thr - pro - lys - his - asn - met - lys - ala - phe - leu) et localisé dans la partie N-terminale de la structure extracellulaire du PSMA. Il a été sélectionné pour sa capacité à marquer les cellules épithéliales prostatiques humaines normales par immuno-histochimie. Cet anticorps reconnaît spécifiquement les cellules cancéreuses prostatiques canines du

c) Les cellules et la tumeur prostatique obtenues par greffage des cellules ne sont pas reconnues par des anticorps monoclonaux dirigés contre la cytokératine 18 (Dako) ni contre des récepteurs androgéniques des cellules épithéliales prostatiques humaines.

5 Une lignée cellulaire établie selon l'invention est la lignée DPC-1
déposée à la CNCM le 6 août 1999 sous le numéro I-2279. Cette lignée a
un temps de doublement de 27 heures, qui n'est pas modifié par la
présence de di-hydrotestostérone à différentes concentrations. Elles ne
forment pas de colonies en agar. Son caryotype est de 67 à 70
chromosomes au lieu des 78 chromosomes normaux dans les lignées
cellulaires canines. Sa tumorégénérité est de 100 % chez la souris nude en
10 3 à 5 semaines. L'ensemble des caractérisations immunoscintigraphiques
et histo-chimiques de la lignée est décrit dans l'exemple 1 ci-dessous.

La présente invention porte également sur un animal mammifère non humain porteur d'une tumeur prostatique susceptible d'être obtenue après greffage dans la prostate dudit animal de 10^7 à 10^9 cellules d'une lignée cellulaire établie après mise en culture d'une tumeur prostatique, de préférence issue de la même espèce animale, dissociée mécaniquement puis trypsinée après plusieurs passages dans un milieu nutritif. L'espèce en question préférée est le chien. La tumeur prostatique provoquée chez cet animal selon l'invention présente les mêmes caractéristiques que celles de la lignée cellulaire selon l'invention. Ces caractéristiques sont communes à une tumeur prostatique de chien et à une tumeur prostatique humaine. L'animal selon l'invention, et de préférence le chien, constitue donc un excellent modèle de laboratoire reproduisant les caractéristiques de la tumeur prostatique humaine et donc en fait un outil de choix dans les expérimentations pré-cliniques de substances susceptibles de soigner le cancer prostatique chez l'homme et chez le chien.

C'est également l'un des objets de la présente invention de fournir
30 une méthode pour identifier une substance susceptible de traiter une

tumeur de la prostate, ladite méthode incluant l'administration à des doses effectives de ladite substance à un animal, et la détection et la mesure par comparaison avec une substance non suspecte d'avoir un effet thérapeutique d'une incidence sur une réduction de ladite tumeur.

5 L'animal en question dans cette méthode est un animal porteur d'une tumeur prostatique, elle-même développée par greffage de cellules d'une lignée préalablement établie, ladite lignée provenant de la mise en culture d'une tumeur prostatique préalablement développée dans un animal de préférence de la même espèce que l'animal auquel les cellules 10 sont greffées. De façon préférée, l'animal en question est le chien compte tenu des similitudes des caractères phénotypiques et histologiques des tumeurs prostatiques chez le chien et chez l'homme.

15 Par dose effective, on entend, comme dans toute méthode de screening, l'administration d'une dose susceptible d'avoir un effet préventif ou curatif sur le développement d'un cancer de la prostate.

Par substance, on entend toute substance d'intérêt thérapeutique potentiel qu'il s'agisse par exemple d'une substance organique basée sur différents squelettes chimiques de base ou de macromolécules biologiques ayant un effet de répression ou d'inhibition de l'expression de gènes 20 spécifiques de la prostate ; cela peut être enfin un vecteur ou d'une particule virale porteur d'une séquence d'intérêt appropriée pour la thérapie génique de ce type de cancer.

25 Par « gène spécifique de la prostate », on entend ici un gène dont l'expression est limitée aux cellules de la prostate et plus particulièrement à ses cellules épithéliales, et dont l'expression est généralement indétectable dans des cellules normales dérivées d'autres tissus que ceux de la prostate. De manière générale, et au fur et à mesure que la connaissance de l'étiologie du développement du cancer de la prostate permettra de faire l'hypothèse que tel ou tel candidat pourrait permettre de faire régresser une 30 tumeur ou transformer une cellule tumorale en cellule normale. La méthode

Anticorps utilisés :

Les anticorps utilisés sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous.

Paramètres	Type Ac	Résultats
Cytokératine 8	M	Neg
Cytokératine 14	M	Pos
Cytokératine 18	M	Neg
Cytokératine 19	M	Pos
Vimentine	M	Pos
Ki 67	M	Pos
PSA	P	Pos
PAP	M	Neg
CGA	P	Neg
NSE	M	Neg
Récepteur Androgènes	M	Neg
Récepteur EGF	M	Neg
Récepteur FGF	M	Neg
PSMA (PSM-P12)	M	Pos

Dans la colonne centrale, la lettre "M" indique qu'il s'agit d'un anticorps monoclonal et la lettre "P" d'un anticorps polyclonal. Dans la troisième colonne, le terme "Pos" indique l'existence d'une réaction positive entre l'anticorps monoclonal ou polyclonal sur la lignée établie canine.

Résultats en immunofluorescence :

Les photographies de la figure 1 sont une illustration du caractère non ambigu de la réactivité de la lignée DPC-1 avec l'anticorps monoclonal anti-cytokératine 19 (1a) ou le polyclonal anti-PSA humain (1b).

La figure 2 indique clairement que le nouvel anticorps monoclonal anti PSMA-P12 humain reconnaît aussi bien la lignée canine DPC-1 que la lignée humaine LNCaP (figures 2a et 2b respectivement). Les expériences

Exemple 4 : spécificité de l'anticorps monoclonal PSMA - P12

Nous rappelons que cet anticorps monoclonal a été produit contre un peptide de 20 acides aminés localisés dans la structure extra cellulaire du PSMA. Il a été sélectionné pour ses capacités à marquer les cellules épithéliales prostatiques humaines normales par immuno histochimie. Les 5 figures 2a et 2b indiquent respectivement la spécificité de l'anti PSMA P12, tant sur la lignée canine DPC-1 que la lignée humaine LNCaP, ce qui en tant que tel est un argument important en faveur de la validité de cette lignée comme modèle de lignée prostatique tumorale humaine. La figure 6 10 montre que cet anticorps est spécifique tant sur les cancers de prostate humain que sur les cancers de prostate canin, ce qui indique également que le modèle animal porteur de la tumeur établie après greffage des cellules de la lignée DPC-1 est un modèle dont la tumeur reflète fidèlement 15 les caractéristiques d'une tumeur humaine. Il a en effet été observé que cet anticorps présente la même spécificité pour la prostate canine (figure 6) que pour la prostate humaine (figure 7).

L'ensemble des expériences décrites ci-dessus indique que l'invention fournit à l'homme du métier un moyen direct de réalisation d'un 20 modèle animal de tumeur prostatique utilisable notamment dans la recherche pré clinique. Ces expériences démontrent également que le nouvel anticorps monoclonal sélectionné est un outil de choix dans le diagnostic et le suivi thérapeutique du cancer de la prostate.

30
REVENDICATIONS

1. Lignée cellulaire établie obtenue après dissociation et mise en culture de cellules d'une tumeur prostatique spontanée existant chez un animal B, les cellules de ladite lignée étant susceptibles d'être greffées dans la prostate d'un animal A de la même espèce ou d'une espèce différente, et caractérisée :
 - en ce qu'elle contient des antigènes reconnus par les anticorps anti-PSMA humains ;
 - 10 - son caryotype est d'au moins 60 chromosomes,
 - son temps de doublement est de 20 à 35 heures et n'est pas modifié par la dihydrotestostérone ;
 - elle ne forme pas de colonies en agar.
2. Lignée selon la revendication 1 reconnue par l'anticorps anti-PSMA humain PSM-P12 déposé à la CNCM le 6 août 1999 sous le n°I-2280.
- 15 3. Lignée selon l'une des revendications 1 ou 2 porteuse des antigènes reconnus par les anticorps spécifiques de la cytokeratine 19 et la vimentine de cellules prostatiques humaines.
- 20 4. Lignée selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 porteuse des antigènes reconnus par les anticorps dirigés contre l'antigène Ki67 humain et/ou contre l'antigène PSA humain.
- 25 5. Lignée selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 porteuse des antigènes non reconnus par les anticorps dirigés contre la cytokératine 18 et/ou contre les récepteurs androgéniques des cellules épithéliales prostatiques.
- 30 6. Lignée selon les revendications 1 à 5 caractérisée en ce que c'est la lignée DPC-1 déposée à la CNCM le 6 août 1999 sous le n° I-2279.
7. Animal mammifère non humain porteur d'une tumeur prostatique, susceptible d'être obtenu par greffage dans la prostate dudit

FEUILLE MODIFIÉE

31

animal de 10^7 à 10^9 cellules d'une lignée cellulaire établie selon l'une des revendications 1 à 6.

8. Animal selon la revendication 7 caractérisé en ce que la tumeur prostatique présente les mêmes caractéristiques que la lignée cellulaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 et sont caractéristiques du cancer de la prostate chez l'homme.

9. Animal non humain selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'il est de la même espèce que l'animal dont provient la lignée cellulaire.

10. Animal non humain selon la revendication 9 caractérisé en ce que l'espèce est le chien.

11. Méthode pour identifier une substance susceptible de traiter une tumeur de la prostate, ladite méthode incluant l'administration à des doses effectives de ladite substance à un animal selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, et la détection et la mesure, par comparaison avec une substance non suspecte d'avoir un effet thérapeutique, d'une incidence sur une réduction de ladite tumeur.

12. Méthode selon la revendication 11 dans laquelle l'incidence est détectée et mesurée par immunoscintigraphie et/ou par examen histologique d'une biopsie de la tumeur.

20 13. Méthode selon la revendication 11 dans laquelle et la détection et la mesure sont réalisées avec un anticorps monoclonal anti PSMA humain.

25 14. Méthode selon la revendication 13 dans laquelle l'anticorps monoclonal anti PSMA humain est l'anticorps PSM-P12 déposé à la CNCM le 6 août 1999 sous le n° I-2280 ou un équivalent fonctionnel de celui-ci reconnaissant le peptide 44-62 de l'antigène PSMA.

15. Méthode selon la revendication 11 dans laquelle la substance est le cas échéant couplée à un ligand d'un récepteur spécifique des cellules tumorales de la prostate.

30 16. Méthode selon la revendication 15 dans laquelle le ligand est

un anticorps monoclonal spécifique d'un antigène de surface de la cellule prostatique, notamment l'anticorps PSM-P12.

17. Méthode selon la revendication 15 dans laquelle un anticorps anti-idiotype reconnaissant le site conformationnel du couplage entre le PSMA des anticorps spécifiques du PSMA est utilisé pour prévenir l'internalisation de ces derniers.

18. Procédé d'obtention d'un médicament pour la prophylaxie ou le traitement des tumeurs de la prostate caractérisé en ce que l'on met en œuvre, en tant que constituant essentiel dudit médicament, un anticorps anti PSMA spécifique de la partie N-terminale de la structure extracellulaire du PSMA couplé à une substance identifiée selon la méthode de la revendication 11 .

19. Procédé selon la revendication 18 dans lequel le médicament est un médicament de thérapie génique et la substance choisie parmi les vecteurs ou les virus défectifs utilisés dans ce type de thérapie.

20. Procédé selon la revendication 18 dans lequel la substance est une substance chimique choisie dans le groupe constitué des hormones GHRH ou l'un de leurs analogues.

21. Procédé selon l'une des revendications 18 à 20 dans lequel l'anticorps anti PSMA est l'anticorps PSM-P12 déposé à la CNCM le 6 août 1999 sous le n° I-2280 ou un équivalent fonctionnel de celui-ci reconnaissant les peptides 44-62 (lys - ser - ser - asn - glu - ala - thr - asn - ile - thr - pro - lys - his - asn - met - lys - ala - phe - leu) de l'antigène PSMA.

22. Anticorps PSM-P12 déposé à la CNCM le 6 août 1999 sous le n° I-2280 ou un équivalent fonctionnel de celui-ci reconnaissant le peptide 44-62 (lys - ser - ser - asn - glu - ala - thr - asn - ile - thr - pro - lys - his - asn - met - lys - ala - phe - leu) de l'antigène PSMA.

33

23. Produit de couplage entre un anticorps monoclonal spécifique et une substance d'intérêt thérapeutique ou diagnostic du cancer de la prostate.

24. Produit de couplage selon la revendication 23, dans lequel
5 l'anticorps est l'anticorps PSM-P12 ou un équivalent fonctionnel de celui-ci reconnaissant le peptide 44-62 (lys - ser - ser - asn - glu - ala - thr - asn - ile - thr - pro - lys - his - asn - met - lys - ala - phe - leu) de l'antigène PSMA.

25. Utilisation de l'anticorps PSM-P12 déposé à la CNCM le
10 6 août 1999 sous le n°I-2280 ou un équivalent fonctionnel de celui-ci reconnaissant le peptide 44-62 (lys - ser - ser - asn - glu - ala - thr - asn - ile - thr - pro - lys - his - asn - met - lys - ala - phe - leu) de l'antigène PSMA dans un procédé de ciblage sur des cellules tumorales de la prostate de substances d'intérêt diagnostic ou thérapeutique.

15